

**PENGARUH PENAMBAHAN SERUM SAPI PADA MEDIA KULTUR TERHADAP KOMPETENSI MEIOSIS OOSIT ANJING DARI BERBAGAI STADIUM ESTRUS SECARA *IN VITRO***

**INFLUENCE OF COWS SERUM ADDITION ON MEIOTIC COMPETENCE OF DOG OOCYTES FROM VARIOUS ESTRUS STADIAE *IN VITRO***

**Yuda Heru Fibrianto<sup>1</sup>, Claude Mona Airin<sup>1</sup>, Asyhari<sup>1</sup>, Amrullah Anindito<sup>1</sup>, Nuraini Rachmawati<sup>1</sup>, Koko Kurniawan<sup>1</sup>, Pradityo Yoga Wibowo<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup>Bagian Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta  
Email: fibrianto1802@gmail.com**

**ABSTRACT**

Reproduction technology achievement on canine was fast developed, with born of cloning and transgenic dog, unfortunately that's technology still used oocyte matured in vivo because canine oocyte maturation in vitro in this animal not developed yet and maturation rate still low. The present study was to investigate the effects of cow serum supplementation on meiotic resumption of canine oocytes from various estrus stage. Ovary obtained from bitches at an-, pro- and di-estrus stage after ovariohysterectomy at clinic veterinary practice. Ovary were placed in 0.9% physiological saline added 1% penicillin-streptomycin with temperature 37°C and then brought to laboratory. Ovary washed several times used PBS and oocytes were obtained by slicing ovarian tissue in tissue culture medium (TCM)-199 supplemented with 25 mM Hepes, 1% penicillin-streptomycin. Selected cumulus oocyte complexes (COCs) were matured in TCM-199 as control and TCM-199 + 10% cow serum as treatment, on incubator with 38°C, 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>. After 72 h incubation and Hoechst 33342 staining, the result shows that cow serum supplement have higher meiotic resumption significantly ( $P < 0.05$ ) in MI achievement than in control and oocyte from proestrus have higher meiotic competent (46.5%) comparing oocyte from anestrus (29.4%) significantly ( $P < 0.05$ ) but not significantly ( $P > 0.05$ ) with diestrus stages (34.8%).

**Key words:** meiosis, oocyte, ovarium, cows serum

**ABSTRAK**

Teknologi reproduksi pada anjing telah berkembang dengan pesat dengan dihasilkannya anjing kloning dan anjing transgenik. Teknologi tersebut masih menggunakan oosit anjing yang masak secara *in vivo* karena teknologi pemasakan sel telur anjing belum berkembang dengan baik dan laju maturasinya masih sangat rendah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan serum sapi pada media kultur terhadap kompetensi meiosis oosit anjing dari berbagai stadium estrus secara *in vitro*. Kompleks sel telur dikoleksi dari ovarium anjing stadium an-, pro-, dan diestrus dari anjing yang diovariohisterektomi dan dibawa ke laboratorium di dalam 0.9% NaCl 37°C. Sel telur diperoleh dengan cara mencacah ovarium di dalam media *tissue culture medium* (TCM)-199 dengan 25 mM Hepes, dan 1% larutan *penicillin-streptomycin*. Sel telur yang terkoleksi dimasakkan ke dalam media TCM-199 sebagai kontrol dan TCM-199 + 10 serum sapi sebagai perlakuan, pada inkubator dengan suhu 38°C, 5% CO<sub>2</sub> dan 5% O<sub>2</sub>. Setelah inkubasi selama 72 jam dan pengecatan dengan Hoechst 33342 diperoleh hasil bahwa penambahan serum sapi 10% pada media kultur memberikan perkembangan meiosis yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dalam mencapai stadium MI daripada kontrol,

dan oosit dari stadium proestrus mempunyai kompetensi meiosis yang lebih tinggi (46,5%) dipitaing oosit dari anestrus (29,4%) secara signifikan ( $P < 0,05$ ), tetapi tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dengan stadium diestrus (34,8%).

**Kata kunci:** meiosis, oosit, ovarium

## PENDAHULUAN

Telah lahir anjing afghanhound hasil kloning pertama di dunia (Lee dkk., 2005), serigala hasil interspesies cloning (Kim dkk., 2007), dan anjing transgenik yang berpendar (Hong dkk., 2009). Keberhasilan teknologi cloning pada dua jenis hewan ini merupakan terobosan baru di dalam dunia keilmuan, walaupun dari kedua hasil yang luar biasa ini diperoleh dengan menggunakan sel telur yang masak secara alami di dalam tubuh (*in vivo*) dari anjing yang digunakan sebagai pendonor sel telur. Pemakaian sel telur yang masak secara *in vivo* di karenakan adanya kekurangberhasilan pemasakan buatan sel telur anjing (*in vitro*) yang umumnya dilakukan pada kloning hewan lain. Pemasakan sel telur di luar tubuh (*in vitro* maturation, IVM) yang sesuai dan baik bagi pertumbuhan dan pemasakan sel telur ini merupakan sebuah prasyarat penting dalam berbagai bioteknologi yang menggunakan sel telur anjing seperti pembuahan di luar tubuh, produksi embrio dan cloning (Lanza dkk., 1999).

Pengembangan sistem kultur yang akan menghasilkan sel telur yang siap difertilisasi akan sangat bermanfaat, tidak hanya untuk mengetahui proses folikulogenesis, tetapi juga preservasi dan penyimpanan jangka panjang dari sel kelamin betina (Carrol dan Godsen, 1993).

Berbagai usaha telah dilakukan untuk meningkatkan efisiensi sistem IVM pada anjing,

tetapi laju pemasakan sel telur anjing *in vitro* masih sangatlah rendah (<20%) (Luvoni dkk., 2003; Otoi dkk., 2000; Songsasen, 2002) diiringi dengan tingginya hal yang tak terduga dipitaing dengan mamalia lain seperti sapi, babi dll. (Saha dkk., 2000; Telfer dkk., 2000; Hyun dkk., 2003). Media kultur adalah faktor yang paling penting untuk system IVM sehingga banyak para peneliti telah mencoba untuk mengidentifikasi kondisi kultur yang memadai dan sesuai untuk sel telur anjing, seperti: media kultur yang berbeda dengan berbagai macam tambahan sumber energi, serum atau hormon (Nickson dkk., 1993; Hewitt dan England, 1998; Otoi dkk., 1999; Srsen dkk., 1998; Songsasen dkk., 2003; Rodrigues, Rodrigues 2003), tetapi hasil yang diperoleh masih jauh dari yang diharapkan seperti sistem IVM yang diperoleh pada hewan domestic lainnya (Sha dkk., 2000; Telfer dkk., 2000; Hyun dkk., 2003; Bogliolo dkk., 2004). Perubahan yang terjadi pada tingkat inti dan sitoplasma dari sel telur anjing selama proses pertumbuhan dan pemasakan sangat berbeda dengan sel telur mamalia lainnya, sehingga dibutuhkan kondisi dan persyaratan tersendiri untuk lingkungan mikro dari media kulturnya.

Pertumbuhan dan pemasakan sel telur pada anjing berbeda sangat nyata dari hewan mamalia jenis lain. Pada anjing, sel telur mengalami pemasakan di dua tempat, setelah mengalami pemasakan pertama di dalam folikel, sel telur di ovulasikan dari ovarium pada stadium germinal vesikel

(GV) dan mengalami pemasakan kedua didalam bagian belakang oviduk sekitar 2-5 hari (Tsutsui, 1989). Komplek kumulus dan sel telur anjing yang diovulasikan, akan bertahan hidup di oviduk untuk periode yang lama dengan sedikit atau tidak ada ekspansi dari sel kumulus untuk periode waktu yang lama dengan sedikit atau tidak ada ekspansi dari sel kumulus dan sel Korona, radiata tetap menempel sampai setelah setelah fertilisasi. Oleh karena itu, dibutuhkan cara pendekatan berdasarkan pada kondisi lingkungan dari oviduk untuk pemasakan sel telur anjing di luar tubuh. Oviduk mengeluarkan berbagai komponen termasuk ion, vitamin, protein dan karbohidrat, hanya cairan oviduk, sel oviduk dan cairan oviduk buatan yang digunakan sebagai media atau media tambahan (Hewit dan England 1998; Bolomba dkk., 2002; Luvoni dkk., 2003).

Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh dari penambahan serum sapi pada media terhadap proses pertumbuhan dan pemasakan oosit anjing pada berbagai stadium estrus secara *in vitro* karena serum sapi adalah bahan yang mudah didapat dan banyak mengandung nutrisi yang diperlukan seperti yang terdapat pada cairan oviduk.

## MATERI DAN METODE

Bahan penelitian. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ovarium anjing betina sehat, 0,9 % NaCl; PBS (*Phosphate Buffered Saline*); *Penicillin* dan *streptomycin* (Sigma, USA); *tissue culture medium* (TCM)-199 (Gibco, USA); 25 mM Hepes (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*); Hoechst 33342 (Sigma, USA).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, skalpel, gunting, pinset,

termometer, termos penyimpan ovarium, mikroskop *stereol/inverted* dengan *fluorescen*, mikropipet, inkubator CO<sub>2</sub>.

Pembuatan 10% Serum Sapi. Serum dibuat dari darah sapi yang diambil dari rumah potong hewan. Darah tersebut dibekukan hingga terpisah antara zat padat yang terkandung di dalam darah dengan cairannya. Serum kemudian difilter dengan menggunakan mikrofilter ukuran 0,45µm, disimpan dalam tabung ependorf 1,5 mL, dan dibekukan dalam freezer untuk digunakan sewaktu-waktu dalam pembuatan media kultur.

Koleksi ovarium dilakukan dari anjing betina sehat, umur lebih dari 6 bulan yang diperoleh setelah operasi ovariohisterektomi pada klinik praktek dokter hewan. Saluran peranakan ditempatkan pada larutan 0,9 % NaCl yang telah ditambah *penicillin* dan *streptomycin* kemudian dimasukkan ke dalam termos dengan temperatur sekitar 35-37 °C, selanjutnya dibawa ke laboratorium. Stadium siklus estrus dievaluasi berdasarkan penampakan gambaran luar dari ovarium setelah ovarium tersebut diambil dari saluran peranakannya, terlihat adanya satu atau lebih follikel (diameter 2-10 mm), Diestrus (fase luteal), terlihat adanya satu atau lebih korpus luteum.

Koleksi sel telur dilakukan dengan cara ovarium diambil dan dicuci beberapa kali dengan PBS. Koleksi oosit dilakukan dengan metode pencacahan. Metode pencacahan dilakukan dengan cara mencacah ovarium dengan menggunakan skalpel pada suhu ruangan dalam medium *tissue culture medium* (TCM)-199 dengan 25 mM Hepes, 1 % larutan *penicillin-streptomycin*. Koleksi dan seleksi oosit dilakukan di bawah mikroskop dan hanya oosit grade satu yang digunakan untuk bahan penelitian.

Klasifikasi kualitas oosit yang dipakai berdasarkan metode Hewitt (1997), yang membagi menjadi 3 tipe kelas, yaitu: *grade 1*) oosit berwarna gelap dan sepenuhnya dikelilingi oleh satu atau lebih lapisan sel kumulus; *grade 2*) oosit transparan dengan lapisan sel kumulus yang tidak sempurna; *grade 3*) oosit pucat, tidak utuh, dan tanpa lapisan sel kumulus.

Oosit hasil koleksi dicuci tiga kali untuk selanjutnya dikultur pada medium TCM-199 tanpa penambahan serum (sebagai control) dan TCM-199 yang telah ditambahkan serum sapi 10%. Sel telur diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 38°C, kelembaban udara 5% CO<sub>2</sub> dan 5% O<sub>2</sub> selama 72 jam. Setelah inkubasi, sel telur dilepaskan dari kumulus dengan cara berulang kali memipet selama 10 menit dalam *Tissue Culture Medium* (TCM)-199 yang mengandung 0,5 mg/mL *hyaluronidase*. Sel telur yang telah hilang kumulusnya difiksasi menggunakan cairan formaldehyde-Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO) selama 15 menit dan dicuci dengan PBS. Sel telur dipindahkan ke deck glass dan dicat dengan 1,9 µM Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, MO) dalam gliserol (Sigma, St Louis, MO). Status kromatin dan posisi spindle dan migrasinya diamati di bawah lampu UV untuk menentukan stadium meiosis dari perkembangan sel telur seperti stadium Germinal Vesicle (GV), Germinal Vesicle Breakdown (GVBD), Metafase I (MI), Metaphase II (MII).

Data penelitian dianalisa dengan menggunakan metode ANOVA, sedangkan analisa pencapaian perkembangan meiotik menggunakan metode *chi-square*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan perkembangan oosit diperoleh hasil pada stadium proestrus yang mencapai stadium Metafase I (MI) menggunakan media yang ditambahkan serum sapi 10% sebesar 46,5% untuk pada media yang tidak ditambahkan serum hanya mencapai 12,5%. Sedangkan oosit yang degenerasi setelah diamati mencapai 5%. Pada stadium diestrus diperoleh stadium MI mencapai 34,8% pada media yang ditambahkan serum sapi 10% dan 24,5% pada media yang tidak diberi serum sapi, tidak nampak adanya oosit degenerasi. Pada stadium anestrus, perkembangan oosit mencapai stadium MI menggunakan media yang ditambahkan serum sapi 10% sebesar 29,4% dan pada media yang tidak ditambahkan serum hanya mencapai stadium GVBD sebesar 88,9% dan tidak terlihat adanya oosit yang degenerasi. Penambahan serum sapi 10% pada media kultur memberikan perkembangan meiosis yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dalam mencapai stadium MI daripada kontrol dan oosit dari stadium proestrus mempunyai kompetensi meiosis yang lebih tinggi (46,5%) dipitaing oosit dari anestrus (29,4%) secara signifikan ( $P < 0,05$ ), tetapi tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dengan stadium diestrus (34,8%) (Tabel 1).

Tabel 1. Kompetensi meiotik oosit anjing dari berbagai stadium estrus yang ditanam pada media kultur yang ditambahi 10% serum sapi

Stadium	Media	$\Sigma$ oosit	Stadium maturasi inti sel			
			GV	GVBD	MI-MII	Degenerasi
Proestrus	tanpa serum	40	25%	57,5%	12,5% <sup>a</sup>	5%
	10%Serum sapi	58	10,3%	34,4%	46,5% <sup>b</sup>	8,6%
Diestrus	tanpa serum	45	22,2%	53,3%	24,5% <sup>a</sup>	-
	10%Serum sapi	69	17,4%	34,7%	34,8% <sup>a</sup>	8,7%
Anestrus	tanpa serum	18	11,1%	88,9%	-	-
	10%Serum sapi	17	9,4%	41,2%	29,4% <sup>a</sup>	-

Ket.: <sup>a</sup><sup>b</sup>Superscrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ), GV: Germinal Vesikel; GVBD: Germinal Vesikel Break Down, MI: Metafase I; MII: Metafase II

Mekanisme reproduksi anjing betina berbeda dengan mekanisme pada mamalia yang lain. Oosit anjing diovasikan pada stadium Germinal Vesikel dan membutuhkan waktu 2-5 hari untuk mencapai pemasakan yang sempurna, sedangkan mamalia lain sel telur diovasikan dalam keadaan masak (stadium metafase II) dan siap untuk dibuahi. Martin dkk. (2006) menunjukkan bahwa oosit pada stadium estrus, oosit yang dikultur berkembang secara cepat mencapai MI dengan persentase 15,3%. Konsentrasi plasma progesteron dalam anjing betina meningkat selama fase proestrus sebagaimana waktu puncak estradiol. Concanon dkk. (1975) menyatakan bahwa oosit dalam kondisi progesteron yang tinggi sebelum ovulasi.

Banyak macam serum yang telah digunakan sebagai zat penambah untuk mendapatkan lingkungan yang maksimal sebagaimana kondisi dalam lingkungan oviduk, tempat oosit diovasikan secara *in vivo*. Serum anak sapi atau serum anjing estrus dengan konsentrasi yang bermacam-macam

telah dilaporkan digunakan (Mahi dan Yanagimachi, 1976; Yamada dkk., 1992; Nickson dkk., 1993; Hewitt dan England, 1998). *Fetal bovine* serum hanya mendukung kehidupan oosit dalam media jika konsentrasinya lebih dari 10% dengan tidak memberikan efek yang menguntungkan terhadap maturasi. Namun Bolamba dkk. (2002) melaporkan bahwa penambahan serum anak sapi dengan albumin serum sapi pada media sederhana menunjukkan tidak essential untuk membantu pemasakan oosit anjing secara *in vitro*.

Perpitaingan antara penambahan serum anjing estrus dengan serum sapi estrus menunjukkan perpitaingan tingkat pertumbuhan lebih baik untuk serum anjing estrus (10,4% : 4,2%) dalam pencapaian stadium Metafase I (MI). Penambahan serum pada media memberikan pengaruh yang bermacam-macam : serum anjing estrus (CES) dapat meningkatkan pengaruh dari maturasi oosit (Otoi, 1999) sedangkan dilaporkan tidak memberikan pengaruh pada penelitian yang lain

(Rodrigues dkk., 2003); penambahan 0,3% BSA (bovine serum albumin) secara langsung memberikan hasil yang lebih baik dari pada serum anak sapi, dan dengan konsentrasi serum 20% merupakan penambahan paling optimal untuk penanaman 96 jam (Hewitt dan England, 1998); keberadaan dari serum bermanfaat untuk mencegah terjadinya pengerasan zona pelusida.

Ketidakpastian hasil dari penambahan serum dikarenakan darah mempunyai kandungan tidak hanya protein, disamping komponen protein (albumin), beberapa hormon seperti gonadotrophin, steroid, dan factor pertumbuhan atau sitokin. Hal inilah yang menyebabkan alasan sulitnya menentukan senyawa spesifik yang memberikan efek positif pada maturasi oosit anjing (Luvoni dkk., 2005). Mungkin kadar hormon atau protein yang terkandung pada serum sapi yang digunakan tidak mempunyai konsentrasi yang cukup untuk perkembangan maturasi oosit anjing. Kemungkinan lain yang bisa terjadi adalah pencampuran pencampuran dari faktor-faktor yang terkandung di dalam serum sapi sehingga mendapatkan hasil yang kurang maksimal, sehingga salah satu faktor dapat bersifat menghambat bagi faktor yang lain.

Protein dalam serum mempunyai pengaruh terhadap perkembangan oosit karena kandungan growth faktor yang terikat bersamanya. Dengan kapasitas yang cukup, albumin serum menyebabkan inaktivasi metabolisme toksik dari produksi oksigen radikal bebas dan mempersatukan komponen yang lain, seperti steroid, vitamin, asam lemak (Luvoni dkk., 2004). Penambahan dan ketersediaan yang baik EGF murni meningkatkan hasil IVM dan dapat berpengaruh terhadap tingkat fertilisasi dan pembelahan sel pada berbagai spesies (Cui dkk.,

2005). Namun, hal yang berbeda ditunjukkan oleh Cui dkk. (2005) yang melaporkan bahwa penggantian serum dengan BSA dapat meningkatkan oosit degeneratif setelah IVM. Kondisi ini mungkin disebabkan karena BSA dan FBS yang dijual dipasaran mengandung beberapa material yang tidak diketahui secara pasti yang dapat berpengaruh terhadap hasil penelitian.

Oosit dipilih dari berbagai stadium estrus karena adanya dugaan bahwa stadium estrus berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti oosit anjing yang dimungkinkan karena besarnya fluktuasi dari reseptor estrogen dan progesteron selama siklus reproduksi akan memberikan perbedaan yang signifikan dalam tingkat IVM. Hasil penelitian menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara stadium siklus estrus terhadap perkembangan oosit anjing yang dimasakkan secara *in vitro*. Stadium proestrus mempunyai persentase yang paling besar untuk mencapai stadium MI dipitaingkan stadium yang lain. Hubungan atau komunikasi antar sel merupakan hubungan antara sel kumulus dan oosit yang memfasilitasi perpindahan nutrisi, ion dan molekul kecil yang lain seperti  $Ca^{2+}$  dan cAMP (Rodrigues dkk., 2002). Hubungan ini tidak ditemukan selama masa anestrus. Sehingga oosit yang ditanam berasal dari stadium anestrus mempunyai kemungkinan kecil untuk mencapai pembelahan meiotik (Luvoni dkk., 2001). Pada data menunjukkan kesesuaian distribusi stadium anestrus mempunyai persentase paling rendah jika dipitaingkan dengan stadium yang lain (88,9% untuk kontrol dan 24,9% pada perlakuan) tingkat perkembangan proestrus yang tinggi mungkin disebabkan ketersediaan dari *gap junction* yang telah terbuka saat perkembangan oosit di dalam folikel.

Pelepasan oosit dari folikel tidak selalu dalam stadium GV, hal ini sesuai dengan penelitian Fujii dkk., 1999 bahwa terdapat 1% (1 oosit) dari pemasakan inti langsung ke stadium MI.

Pada tabel 1 terlihat oosit yang mengalami degenerasi, pada stadium proestrus mencapai 5% pada media TCM-199 tanpa serum, sedang untuk media yang ditambahkan serum mencapai 8%. Pada stadium diestrus hanya media dengan penambahan serum yang menunjukkan terjadinya degenerasi oosit. Banyak peneliti yang menyatakan tingginya tingkat degenerasi pada oosit anjing terjadi sejak pengkoleksian, dan setelah kultur (Hewitt dan England, 1998; Theiss, 2001). Hewitt dan England (1998) melaporkan bahwa efek negatif dari penggunaan serum dapat meningkatkan tingkat degenerasi oosit, sehingga dimungkinkan degenerasi yang terjadi pada stadium proestrus dan diestrus terjadi karena penambahan serum pada media.

Penambahan 10% serum sapi pada media TCM 199 pada maturasi *in vitro* oosit anjing secara keseluruhan tidak memberikan perbedaan yang signifikan dipitaingkan dengan kontrol, hanya mempunyai makna pada stadium proestrus dan anestrus ( $P < 0,05$ ). Jumlah dan persentase oosit pada tiap stadium perkembangan meiosis tergantung dari stadium siklus estrus. Baik penambahan 10% serum maupun kontrol memberikan hasil yang berbeda pada persentase perkembangan stadium meiosis tiap-tiap stadium siklus estrus.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktur PHKA2 Fakultas Kedokteran Hewan tahun

2007 yang telah membiayai penelitian ini dengan dana PHKA2 Bacth I, sehingga penelitian ini berjalan dengan baik dan lancar.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bogliolo, L., Zeda M.T., Ledda S., Leoni G., Naitana S., Pau S. 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod Nutr Dev* 42:265-273.
- Bolamba, D., Borden-Russ, K.D., Durrant, B.S. 1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 49:933-42.
- Concannon, P.W. 1991. *Reproduction in the dog and cat*. In: Cupps PT, editor. *Reproduction in domestic animals*. 4th ed. San Diego: Academic Press Inc.:517-54.
- Concannon, P.W., Cowan, R., Hansel, W. 1979. LH Release In Ovariectomized Dogs In Response To Estrogen Withdrawal And Its Facilitation By Proesterone. *Biol Repro* 17:604.
- Cui, X.S., Jin, Y.X., Shen, X.H., Lee, J.Y., Lee, H.S., Yin, X.J., Kong, I.K., Kim, N.H. 2006. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology* 66:267-274
- Fujii, M., Otoi, T., Murakami, M., Tanaka, M., Une, S., Suzuki, T. 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci*. 62(3):305-7.
- Hewitt, D.A., England, G.C.W. 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* 49:957-966.
- Hewitt, D.A. 1997. *Oocyte Maturation and Fertilisation in the Bitch; The Use of In Vitro Culture*. PhD Thesis, University of London.
- Hyun, S.H., Lee, G.S., Kim, D.Y., Lee, S.H., Kim, S., Lee, E.S., Lim, J.M., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. 2003. Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the

- development of cloned pig embryos. *Theriogenology* 59:1641-1649.
- Lanza, R.P., Cibelli J.B., West, M.D. 1999. Human therapeutic cloning. *Nat Med* 5:975-7.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Fibrianto, Y., Kim, H.J., Hossein, M.S., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cell. *Nature*: 436-641
- Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Dom Anim* 38(5):410-414.
- \_\_\_\_\_. 2004. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63:41-59.
- \_\_\_\_\_. 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63:41-59
- Luvoni, G.C., Luciano, A.M., Modina, S., Gandolfi, F. 2001. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocytes on the efficiency of in vitro maturation. *J. Reprod Fertil Suppl* 57:141-146.
- Mahi, C. A., Yanagimachi, R. 1976. Maturation and Sperm Penetration of Canine Ovarian Oocyte In Vitro. *J. Exp. Zoo.*, 196:189-196.
- Martins, L.R, Ponchirolli C.B., Beier S.L., Landim-Alvarenga, F.C., Lopes, M.D. 2006. Analysis of Nuclear Maturation in In Vitro Matured Oocytes From Estrous and Anestrous Bitches. *Anim. Reprod.*, v.3, n.1:49-54.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton, J.P. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 47:231-40.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westhusin M. 2002. Effect of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocyte. *Reproduction* 124:775-781.
- Rodrigues, B.A., Rodrigues, J.L. 2002. Maturation of canine oocytes in TCM-199 supplemented with different proteins. In : Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Veterinary Society of Small Animal Reproduction Congress, 2002, Liege, Belgium. Liege: EVSSAR:94-95.
- \_\_\_\_\_. 2002. Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under heterologous hormone supplementation. In : Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Veterinary Society of Small Animal Reproduction Congress, Liege, Belgium. Liege : EVSSAR:58-159.
- \_\_\_\_\_. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 60:9-66.
- Saha, S., Shimizu, M., Geshi, M., Izaiki, Y. 2000. In vitro culture of bovine preantral follicle. *Anim Reprod Sci* 63:27-39.
- Songsasen, N, D.E. Wildt. 2007. Oocyte Biology And Challenges In Developing In Vitro Maturation Systems In The Domestic Dog. *Animal reproduction Science* 98:2-22
- Srsen V, Kalous J, Nagyova E, Sutovsky P, King WA, Motlik J. 1998. Effects of follicle stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alonex lagopus*) oocytes in vitro. *Zygote* 6:299-309.
- Telfer E, Gosden RG. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 81: 137-47.
- Theiss T. 1997. Investigations on the collection, in vitro maturation and -fertilization of dog oocytes. Thesis. Tierartztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil* 39:269-275.
- Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K., Toyoda, Y. 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol Reprod* 46:853-858.